

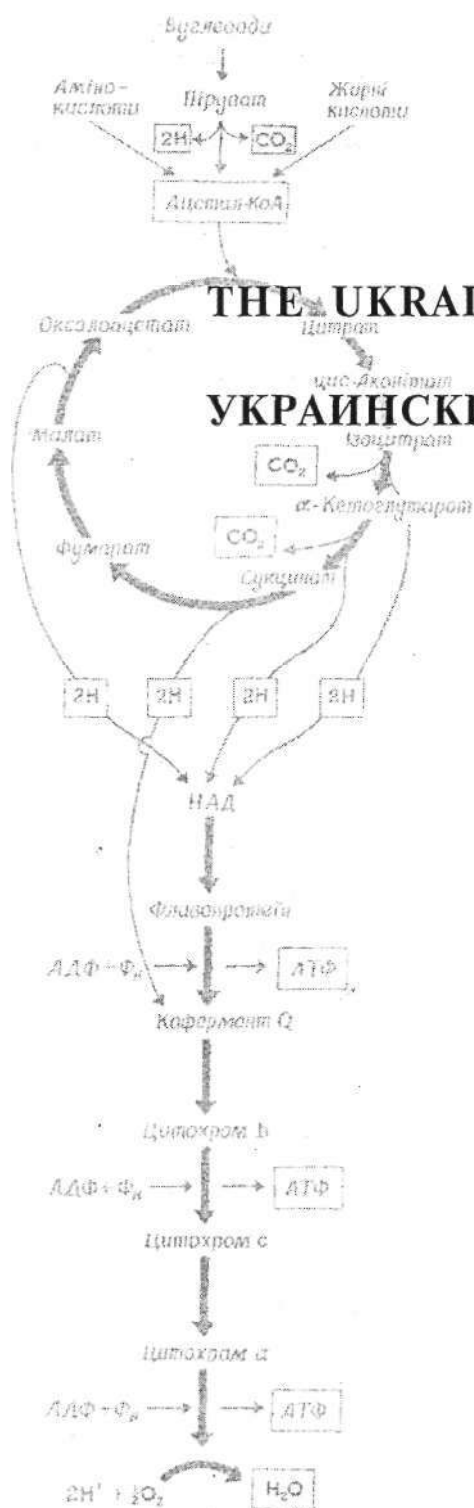
УКРАЇНСЬКИЙ БІОХІМІЧНИЙ

ЖУРНАЛ

THE UKRAINIAN BIOCHEMICAL JOURNAL

УКРАЇНСЬКИЙ БІОХІМІЧЕСЬКИЙ ЖУРНАЛ

ТОМ 71



№ 1 1999

В. Ю. ГАРБУЗОВА, В. В. ДАВЫДОВ

**КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В МИОКАРДЕ ПРИ СТРЕССЕ
У ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС**

Вивчено каталазну активність міокарда за стресу у дорослих та старих щурів. Визначено, що формування іммобілізаційного стресу супроводжується стимуляцією активності ферменту. Більш виражений цей ефект у дорослих тварин. Наведено експериментальні дані стосовно можливої ролі пероксидного окислення ліпідів у стресорній активації каталази міокарда та її модуляції з віком.

Формирование стрессорных поврежденный миокарда сопровождается интенсификацией образования активных форм кислорода в сердце [11,6]. Важную роль в ограничении их альтерирующего влияния на кардиомиоциты оказывают антиоксидантные ферменты, в том числе каталаза [3,4]. Возрастные особенности функционирования этого фермента при стрессе до настоящего времени окончательно не установлены. Выяснение их позволит направленно подойти к решению вопроса о причинах снижения устойчивости миокарда к повреждающему действию стресса на сердечную мышцу при старении организма. Исходя из этого целью работы явилось изучение каталазной активности миокарда при стрессе у взрослых и старых крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на 50 крысах-самцах линии Вистар. Использовали животных двух возрастов: взрослых (10 — 12 мес) и старых — (22 — 25 мес). Обе возрастные группы животных, в свою очередь, делили на 3 подгруппы: 1 — интактные животные, 2 — крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30 мин, 3 — животные, которым за 15 мин до иммобилизации вводился внутривентриально диметилсульфоксид в дозе 175 мг на 100 г массы.

Эффективность развития стресса контролировали патоморфологически по изменению надпочечников и тимуса, а также на основании изменения в крови концентрации глюкокортикоидов.

Животных декапитировали и извлекали сердце. Миокард левого желудочка использовали для приготовления 2%-х гомогенатов на 0,1 М трис-хлоридном буфере, pH 7,4. Свежеприготовленные гомогенаты инкубировали с 20 ММ H₂O₂ в течение 5 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением ТХУ до конечной концентрации 5%, после чего пробы центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин. К

3 мл безбелкового супернатанта добавляли 1,5 мл 4%-го раствора молибдата аммония и определяли оптическую плотность при 410 нм. Активность каталазы выражали в условных единицах. За единицу активности принимали изменение оптической плотности при длине волны 410 нм за время инкубации в расчете на 1 мг белка пробы.

В отдельных исследованиях проводили предварительную инкубацию гомогенатов сердца в среде со стимулированным аскорбатзависимым пероксидным окислением липидов (ПОЛ). Для этой цели гомогенаты вносили в реакционную смесь, содержащую 0,8 мМ аскорбиновой кислоты и 1,2 мкМ соли Мора [5]. Пробы инкубировали в течение 20 — 80 мин при 37 °С, после чего отбирали их образцы для определения каталазной активности.

Содержание белка определяли по Лоури. Полученные данные подвергали статистической обработке по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что активность каталазы в миокарде старых крыс была вдвое ниже, чем у взрослых животных (таблица). При иммобилизационном стрессе происходит увеличение активности фермента в сердце у животных обеих возрастных групп. Однако у взрослых она повышается на 177%, а у старых — только на 54% по сравнению с таковой у интактных крыс.

Учитывая, что стресс сопровождается стимуляцией ПОЛ [7, 12], для выяснения причин обнаруженной активации каталазы было проведено изучение влияния индуцированного ПОЛ на активность этого фермента в гомогенатах сердца.

Полученные данные представлены на рисунке, из которого видно, что инкубация гомогенатов в среде со стимулированным аскорбатзависимым ПОЛ сопровождается фазным изменением активности фермента: 20-минутная экспозиция приводит к активации, а ее дальней-

Каталазная активность миокарда взрослых и старых крыс при стрессе ($M \pm m$; $n = 6$)

Взрослые крысы		Старые крысы	
Интактные	Подверженные стрессу	Интактные	Подверженные стрессу
0,69±0,01	1,91±0,04*	0,32±0,01	0,55±0,01*

* Различия достоверны в сравнении с интактными животными, $p < 0,05$.

шее увеличение — к прогрессирующему во времени ингибированию.

Выраженность сдвигов со стороны каталазы, возникающих под влиянием ПОЛ, зависит от возраста животных. Так, у взрослых крыс 20-минутная инкубация в системе индуцированного ПОЛ сопровождается увеличением активности фермента на 65%, а при 60-минутной инкубации — снижается до 72% от их исходной величины. У старых крыс 20-минутная инкубация приводит к двукратной стимуляции активности каталазы, а к 60 мин инкубации — к снижению до 35% от исходного уровня.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что модулирующий эффект ПОЛ на каталазу в большей мере проявляется у старых, чем у взрослых крыс. Учитывая это, далее было изучено влияние пероксидного окисления на каталазу в сердце крыс, подвергнутых стрессу.

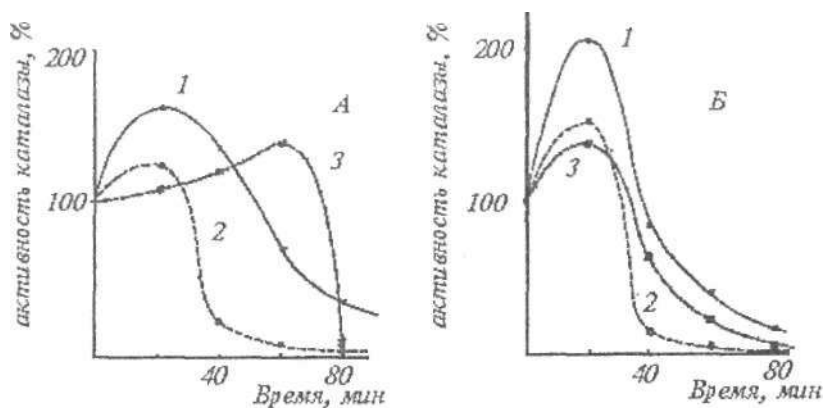
Исследования показали, что динамика активности фермента под влиянием индуцированного ПОЛ у крыс, подвергнутых стрессу, аналогична таковой у интактных животных. Однако при 20-минутной инкубации гомогенатов сердца в среде с активированным аскорбатзависимым

ПОЛ у взрослых крыс увеличение каталазной активности происходит лишь на 25%, а у старых — на 53% по сравнению с исходным уровнем. При увеличении времени инкубации каталазная активность у взрослых крыс снижается до 10%, а у старых — до 9% от исходной величины.

Введение ДМСО перед моделированием иммобилизационного стресса еще более ограничивает эффект кратковременного воздействия ПОЛ на каталазу. Одновременно с этим значительно снижается ингибирующее влияние пероксидного окисления на активность фермента при его 60-минутном воздействии на гомогенат.

Представленные данные свидетельствуют о том, что каталаза миокарда крыс, перенесших стресс, менее подвержена активирующему влиянию ПОЛ, и наоборот, сильнее ингибируется при длительной инкубации фермента в системе со стимулированным аскорбатзависимым ПОЛ. Возрастные различия при этом в большей степени проявляются на уровне активирующего влияния ПОЛ на активность фермента.

Оценивая полученные результаты, необходимо отметить, что они подтверждают имеющиеся в литературе сведения о снижении активности ката-



Влияние индуцированного ПОЛ на каталазную активность миокарда взрослых (А) и старых (Б) крыс. Каталазная активность исходного гомогената миокарда принята за 100%. По оси абсцисс — время инкубации гомогенатов в системе индуцированного ПОЛ. 1 — интактные крысы; 2 — под влиянием стресса; 3 — при введении диметилсульфоксида + стресс.

лазы в тканях при старении [9, 10]. В основе формирования подобного сдвига может быть возрастное нарушение синтеза фермента, связанное с ограничением транскрипции кодирующего его гена [10, 8].

При стрессе, независимо от возраста животных, происходит увеличение активности каталазы в сердце, что, несомненно, приобретает адаптивное значение. Это связано с тем, что в условиях стимуляции образования активных форм кислорода активация каталазы препятствует накоплению пероксида водорода в кардиомиоцитах и тем самым предупреждает их накопление. Ограничение же степени активации каталазы может быть одной из причин снижения устойчивости сердца к повреждающему действию стресса при старении.

Оценивая причины стрессовой активации каталазы, можно предположить важную роль в этом активных форм кислорода, интенсивно генерирующихся в процессе ПОЛ [2]. Эти активные метаболиты могут оказывать прямое влияние на фермент, взаимодействуя с аминокислотными радикалами полипептидной цепи и тем самым изменяя конформацию белковой молекулы. Подобное предположение подтверждается результатами экспериментов с введением диметилсульфоксида перед иммобилизацией животных (рисунок).

Модификация молекулы каталазы под влиянием активных форм кислорода способствует изменению свойств фермента (кинетики катализируемой реакции, взаимодействию с модуляторами и др.). По всей вероятности оно также имеет зависимый от возраста организма характер. Исследование каталитических свойств каталазы открывает перспективы в выяснении тонких механизмов регуляции свободнорадикальных процессов в сердце при стрессе, а значит, и в познании причин изменения резистентности сердца к повреждающему действию стресса при старении. В связи с этим изучению данного вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

V. Y. Garbuzova, V. V. Davidov

CATALASE MYOCARDIUM ACTIVITY AT STRESS IN ADULT AND OLD RATS

S u m m a r y

The study of catalase myocardium activity at stress in adult and old rats has been performed. It has been revealed that the formation of immobilization

stress is accompanied by the enzyme activity stimulation. The expression of this effects is more significant in adult animals. Experimental data concerning the possible role of peroxidation lipids in myocardium catalase stress activation and its age modulation are given.

Sumy State University; Zaporozhye State Medical University

1. *Ceremuzynsky L., Barcikowsky B., Lewicky Z. et al.* // Exp. Pathol. 1991. 43, N 3–4. P. 213–220.
2. *Сауля А.И., Меерсон Ф.З.* Постстрессорные нарушения функции миокарда. Кишинев: Штиинца, 1990. 160 с.
3. *Меерсон Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина, 1984. 270 с.
4. *Меерсон Ф.З.* // Бюллетень ВКНЦ АМН СССР. 1985. 8, № 1. С. 34–42.
5. *Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М.* Перекисное окисление липидов и радиация. Киев: Наукова думка, 1991. 256 с.
6. *Микаэлян Э.М., Мкртчян С.Л.* // Журн. эксперим. и клин. мед. 1987. 27, № 2. С. 119–124.
7. *Mahdi H.* // Arch. Biol. 1985. 96, N 3. P. 354–355.
8. *Nakakimura H., Kakimoto M., Wada S., Mizuno K.* // Chem. and Pharm. Bull. 1980. 28, N 7. P. 2101–2104.
9. *Semsei J., Verzar F.* // Age. 1989. 12, N 3. P. 111–112.
10. *Semsei J., Rao G., Richardson A.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. 164, N 2. P. 620–625.
11. *Richardson A.* // Age. 1990. 13, N 4. P. 97–99.
12. *Козлов Ю.П.* Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М.: Издат. МГУ, 1973. 340 с.

Сумский госуниверситет; Запорожский государственный медуниверситет

Получено 15. 10. 97